

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-195235

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)8月1日

G 01 N 21/64

B 7458-2G

A 7458-2G

33/536

D 7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 蛍光測定装置

⑮ 特 願 平1-14863

⑯ 出 願 平1(1989)1月24日

⑰ 発 明 者 国 田 正 徳 東京都三鷹市牟礼6丁目22番1号 アロカ株式会社内  
⑰ 発 明 者 吉 村 共 之 東京都三鷹市牟礼6丁目22番1号 アロカ株式会社内  
⑱ 出 願 人 アロカ株式会社 東京都三鷹市牟礼6丁目22番1号  
⑲ 代 理 人 弁理士 吉田 研二 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

蛍光測定装置

2. 特許請求の範囲

試料に光源からの所定励起波長の励起光を入射し、該試料中に含まれた蛍光物質により発生される所定蛍光波長の時間と共に変化する蛍光量を測光し、その測光値である時系列信号を測定する蛍光測定装置において、

前記時系列信号を入力し、その周波数成分を分析する周波数分析手段を有し、

前記周波数分析手段により、前記時系列信号の周波数分析結果によって、試料中の蛍光物質及び蛍光物質により標識された物質を特定することを特徴とする蛍光測定装置。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、蛍光測定装置、特に試料に励起光を入射し、試料中の蛍光物質により発生する蛍光を測定し、これによって、蛍光物質により標識され

た試料中の物質を特定する蛍光測定装置に関するものである。

[従来の技術]

医療分野において、生体内微量物質の定量分析法としては、従来から放射性物質を標識としたRIA(放射能免疫分析法)及び酵素を標識としたEIA(酵素免疫分析法)などの測定が行なわれており、このRIA、EIAと共に蛍光物質を標識とし、抗原-抗体反応を利用したFIA(蛍光免疫学的定量法)が広範囲に利用されている。

特に、このFIAは、一般的にある特定量の検体に対して、例えば、一種類の蛍光物質を標識とした試薬などを反応させて、蛍光量の測定を行ない、その検出体中の一種類の抗原量を定量することにある。

そして、このFIAによる蛍光測定装置では、主に、蛍光量自身、蛍光寿命時間あるいは蛍光偏光解消時間の測定を行なっている。

すなわち、蛍光量自身は、定常的励起光による蛍光量であり、蛍光寿命時間は、試料中の蛍光物

質に励起光を入射してから蛍光量が所定値まで減少するまでの時間を示し、また蛍光偏光解消時間は、所定方向の偏光の励起光を入射したときに、試料中の蛍光物質に発生する蛍光の偏光が無偏光状態になるまでの時間を示す。そして、これらの時間測定結果から、蛍光物質や蛍光物質により標識された物質の特定を行なっている。

第6図(A)、(B)には、このようなFIAによる蛍光測定装置の従来例が示されており、以下その構成・作用を説明する。

第6図(A)には、前述した蛍光寿命時間を測定する場合の装置が示されている。

すなわち、従来のFIAによる蛍光測定装置において、励起光源10から、所定の励起波長の励起光10aが試料14へ入射されると、容器内の被検体に含まれている蛍光物質は、照射された励起光10aに応じて所定の蛍光波長の蛍光14aを発生する。そして、この蛍光14aを光検出器18が測光し、測光値として時系列信号18aを出力している。

aと、比較的ゆるやかに減少するカーブbとの比較により、蛍光物質の違いが理解される。

更に、この蛍光量の減少カーブに応じて蛍光寿命時間 $T_1$ が決まり、蛍光物質の特定を可能としている。

次に、第6図(B)には、前述した蛍光偏光解消時間を測定する場合の装置が示されている。なお、第6図(A)との同一部材には同一符号を付し、以下説明を省略する。

この第6図(B)では、前述した第6図(A)とを比較すれば、蛍光偏光解消時間の測定において、所定の偏光方向の励起光を得るために、偏光板12を励起光源10と試料14の間に設け、また、偏光板16を試料14と光検出器18の間に設けたことに違いがある。

すなわち、偏光板12は励起光源10より照射される励起光10aから所定の一方方向(偏光)のみの励起光を得るためのものであり、この励起光が試料中の蛍光物質に照射される。これにより、蛍光物質から蛍光が発生されると、偏光板16は、

ここで、試料14に入射される所定励起波長の励起光10aと、蛍光波長の蛍光14aにより、出力する時系列信号18aが第2図に示されている。

一般に、蛍光14aは、時間と共に変化し、その応答の波形は、蛍光物質によって決定される。

すなわち、第2図に示されているように、励起光10aがパルス波形として試料14に入射されると、励起光のパルス波形立上がりから蛍光14aが発生し、蛍光量が増加し始める。

次に、励起光10aのパルス波形立下がりで励起光はしゃ断されるので、この立下がり時点からは、第2図に示したように蛍光量が減少し、励起光のパルス波形立下がりから時間 $T_1$ 後には蛍光量が0となる。従って、蛍光14aは、時間と共に変化することが理解される。

特に、試料中に含まれている蛍光物質の性質は、第2図に示されているように前述した励起光のパルス波形立下がり時点からの蛍光量の減少カーブa、bに現われ、例えば、急激に減少するカーブ

特定の偏光方向のみの蛍光14aを通過させる。

そして、光検出器18は、その蛍光14aを検出し、測光を行ない、時系列信号18aを出力する。

ここで、第3図には、前述した第2図と同様に、励起光10aと蛍光量(時系列信号18a)とが示されている。第3図において、第2図と相違することは、この時系列信号18aの蛍光偏光解消時間 $T_2$ を測定することによって蛍光物質を特定することにある。

すなわち、試料14の容器に注入された溶液中の分子の細かい運動(ブラウン運動)は、分子量が大きいほど遅くなる。この分子の動きは、分子に標識した蛍光の偏光の時間変化から測定することができる。すなわち、第3図に示す偏波面のそろう励起光10aで、蛍光物質が標識された分子を励起すると、その励起した時点から蛍光が発生し始める。そして、この蛍光14aは、励起光10aのパルス立上がりから立下がり時までは、励起光の偏光方向に応じて偏波面が一定方向にそろっているので蛍光量が増加する。

ところが、そのパルス立下がり後、励起光がしゃ断されると、分子が細かく運動している速度とともに、偏波面が不規則となり、最終的には無偏光になる。

従って、分子の運動速度は、分子量に依存するので、偏光から無偏光になるまでの蛍光偏光解消時間を測定すれば、分子量に相当する蛍光物質を特定することができる。

以上のことから、第3図に示された時系列信号18aは、蛍光偏光解消時間 $T_2$ と共に変化する蛍光量を示したものであり、勿論、第2図と同様に蛍光量の減少する過程において、その減少カーブc、dにより、蛍光物質の特定が可能となる。

〔発明が解決しようとする課題〕

以上のように、試料中の蛍光物質を測定する従来の蛍光測定装置は、前述した第6図(A)、

(B)のように構成されていたので、測光値としての時系列信号18aに基づいて、蛍光量の減少波形、蛍光寿命時間 $T_1$ 、あるいは蛍光偏光解消時間 $T_2$ を測定することにより、蛍光物質、又は

蛍光物質が標識されている物質の特定を行なうことができる。

しかしながら、従来の蛍光測定装置では、時間と共に変化する蛍光量の蛍光寿命時間又は蛍光偏光解消時間だけの測定を行なうため、蛍光量の微妙な変化まで分析することが困難であり、高精度に蛍光物質を分析することはできなかった。

すなわち、従来の蛍光測定装置では、蛍光量の時間的変化が比較的著しい蛍光物質のみしか特定できず、蛍光物質の微妙な蛍光変化を描えることができないため、場合によっては、蛍光物質の特定を誤ってしまったり、あるいは特定することが困難な場合が生じていた。

発明の目的

本発明は上記従来の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、周波数分析手段により、蛍光物質から発生される時間と共に変化する蛍光量を測光し、その測光値である時系列信号の周波数成分を分析することにより、蛍光物質を高精度に解析でき、蛍光物質又は蛍光物質が標識されている

物質を特定することができる蛍光測定装置を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的を達成するために、本発明に係る蛍光測定装置は、試料に光源からの所定励起波長の励起光を入射し、該試料中に含まれている蛍光物質により発生する所定蛍光波長の時間と共に変化する蛍光量を測光し、その測光値としての時系列信号を周波数分析手段に入力して、その周波数成分を分析し、前記時系列信号の周波数分析結果によって、試料中の蛍光物質及び蛍光物質が標識されている物質を特定することを特徴としている。

〔作用〕

上記構成における本発明の蛍光測定装置によれば、励起光により、試料中に含まれた蛍光物質から発生される時間と共に変化する蛍光量を測光し、その測光値である時系列信号を周波数分析手段に入力し、その周波数成分を分析することができる。

この結果、蛍光物質の微妙な蛍光量の変化を描えることが可能となり、蛍光物質を高精度に分析

でき、かつ、試料中の蛍光物質あるいは蛍光物質が標識された物質を確実に特定することができる。

〔実施例〕

本発明に係る蛍光測定装置の好適な実施例を第1図に基づいて説明するが、前述した第6図(A)、(B)の同一部材には同一符号を付して以下説明を省略する。

第1図に示された本発明の蛍光測定装置において特徴的なことは、周波数分析手段として周波数分析装置20を設け、これにより、蛍光物質から発生する蛍光量の測光値である時系列信号18aを周波数分析することにある。この分析結果により、本発明は確実に蛍光物質の特定が可能となる。

従って、第6図(A)、(B)に示されている従来の蛍光測定装置では、蛍光寿命時間 $T_1$ あるいは蛍光偏光解消時間 $T_2$ の測定のみで、蛍光物質を分析していたので、蛍光量の微妙な変化を観察することができず、確実な物質の特定が困難であった。

そして、本発明のような時系列信号の周波数成

分を分析するために周波数分析手段を有する蛍光測定装置は今までには存在していなかった。

第1図に示されている本実施例の蛍光測定装置は、周波数分析手段としての周波数分析装置20を設けており、前述した光検出器18からの測光値である時系列信号18aを入力している。

そして、該周波数分析装置内のアンプ22は、該時系列信号18aを所定レベルまで増幅するために設けられ、A/Dコンバータ24は、アナログ信号である時系列信号18aをデジタル信号に変換するために設けられている。

また、FFT（ファースト・フーリエ・トランスフォーメーション）26は、周波数分析を行なう信号解析部として設けられ、表示装置28は、該FFT26が測定した周波数スペクトルを画像表示するために設けられている。

以下、次に作用について説明する。

前記アンプ22は、時系列信号18aを入力し、所定レベルまで増幅する。そして、増幅された時系列信号18aは、A/Dコンバータ24に入力

ができる。

従って、このパワースペクトル表示により、周波数成分の分布を知るとともに、微妙な分布変化を観察することができ、高精度に時系列信号を分析することが可能となる。これによって、蛍光物質あるいは蛍光物質が標識された物質の特定を確実に行うことができる。

更に、第4図、第5図に示されたスペクトル表示について、詳細に説明する。

例えば、一例として、蛍光寿命時間を測定した場合の、第2図に示されている時系列信号18aを、周波数分析すると、第4図に示すスペクトル分布になる。

ここで、例えば、蛍光物質をAとして、第2図の時系列信号18aを蛍光量の急峻な減少カーブaとすると、スペクトル分布は、第4図のaのようなカーブになり、低い周波数から高い周波数までを含んだ多くの周波数成分が含まれていることが理解される。従って、そのスペクトル半値幅Haは、周波数帯域の広い値になる。

され、該時系列信号をデジタル信号に変換して、FFT26に入力される。

ここで、FFT26は、時系列信号18aを周波数成分に分解し、その周波数分析結果として、表示出力信号を表示装置28へ出力する。従って、表示装置28は、その周波数分析結果として、表示出力信号に基づいて、例えば、周波数電力スペクトルをテレビ画面上に表示することができる。

次に、以下第2図、第3図、第4図、及び第5図を用いて、詳細にその作用を説明する。

第4図、第5図には、第2図、第3図に示された時系列信号18aをFFT26に入力し、周波数分析を行った結果として、表示装置28により画像表示された状態が示されている。

すなわち、これが時系列信号18aの周波数成分を分析したスペクトル分布であり、第4図には、パワースペクトルの形状、及びパワースペクトルPが最大時の1/2になるところの周波数の変化幅を示すスペクトル半値幅Ha、Hbが示されており、これらの特性から蛍光物質を分析すること

次に、他の蛍光物質をBとし、時系列信号18aを蛍光量の急峻な減少カーブaに比べ、比較的ゆるやかなカーブbとすれば、スペクトル分布は、第4図のbのように急激に減少したカーブとなり、高い周波数成分が少なく、直流分を含む低い周波数成分が多く含まれていることが理解される。

従って、スペクトル半値幅Hbは周波数帯域の狭い値となる。

このようにして、本発明の周波数分析装置によれば、従来の時間変化のみの測定に比べ、蛍光物質AとBにおける蛍光量減少カーブaとb、及びスペクトル半値幅HaとHbとの違いを詳細に観察することができ、周波数成分をスペクトル表示することによって高精度に分析することができる。このため、異なる蛍光物質A及びB特有の微妙な蛍光量変化の違いを判別することが容易となる。

次に、他の例として、蛍光偏光解消時間を測定した場合の第3図に示されている時系列信号18aを周波数分析すると、第5図のようなスペクトル分布になる。

すなわち、例えば、試料中に含まれる蛍光物質 C について、前述したように、第 3 図の蛍光量の減少が急峻なカーブ c のときには、第 5 図のスペクトル分布は、c のようなパワースペクトルの変化が激しいカーブになり、この結果、蛍光物質 C は、低周波領域でパワースペクトルの変動が大きい性質を有することが理解される。

また、次に、例えば、蛍光物質 D として、第 3 図の蛍光量の減少がゆるやかなカーブ d のときには、第 5 図のスペクトル分布は、d のようなカーブになり、この蛍光物質 D は、パワースペクトルの変動が少なく、安定した性質を示すことがわかる。この結果から、蛍光の偏光における蛍光物質 C と D との蛍光量の特性上の違いが、スペクトル表示によって明らかになり、本発明によれば、従来の蛍光偏光時間のみの測定に比べ微妙なパワースペクトルレベルの変化まで捕えることができる。

以上のようにして、本発明の特徴である周波数分析装置 20 は、時間と共に変化する蛍光量をパ

ワースペクトル、周波数分布及びスペクトル半値幅を求めることができ、これらの結果から、蛍光物質の発する蛍光量の変化を詳細に調べることができると共に、高精度に分析することが可能となる。

なお、本実施例においては、周波数分析手段としての周波数分析装置 20 を F F T 26 により解析することを示したが、チャープ Z 方式を用いて周波数分析を行うことも可能である。

#### 【発明の効果】

以上のようにして、本発明に係る蛍光測定装置では、試料中に含まれた蛍光物質により発生される時間と共に変化する蛍光量を測定し、測光値としての時系列信号を周波数分析手段により、その周波数成分を分析することができる。

このため、本発明では、従来における蛍光量の時間的変化のみの分析では不可能であった蛍光物質を高精度に測定することができ、スペクトル表示により、蛍光量の微妙な変化を捕えることで、蛍光物質特有の性質を知ることができる。

従って、本発明によれば、蛍光物質及び蛍光物質が標識された物質の特定を確実に行うことが可能となる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の蛍光測定装置のブロック図、  
第 2 図は励起光及び蛍光の波形を示した説明図、  
第 3 図は励起光及び蛍光偏光の波形を示した説明図、

第 4 図、第 5 図は、本発明の蛍光測定装置により、周波数分析結果が示された説明図、

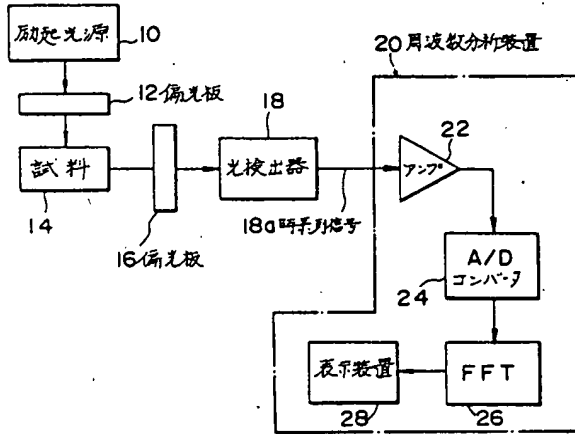
第 6 図 (A)、(B) は、従来の蛍光測定装置のブロック図である。

20 … 周波数分析装置  
22 … アンプ  
24 … A/D コンバータ  
26 … F F T  
28 … 表示装置  
10a … 励起光  
18a … 時系列信号  
Ha、Hb … スペクトル半値幅  
T<sub>1</sub> … 蛍光寿命時間

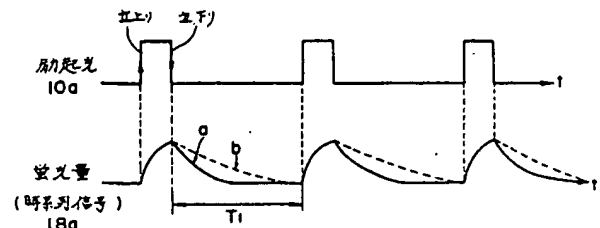
T<sub>2</sub> … 蛍光偏光解消時間。

出願人 アロカ株式会社  
代理人 弁理士 吉田 研二  
(ほか 1 名)

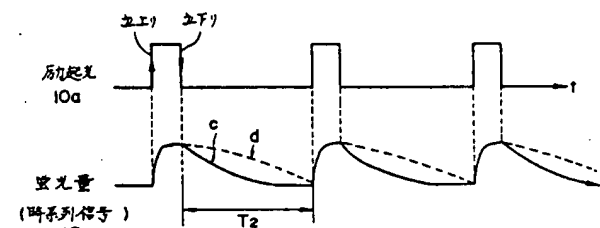
[D-3]



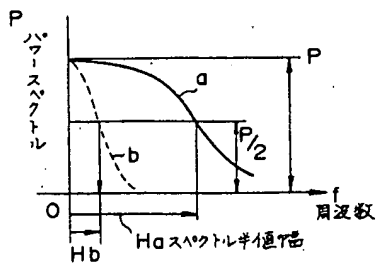
本発明の光測定装置  
第 1 図



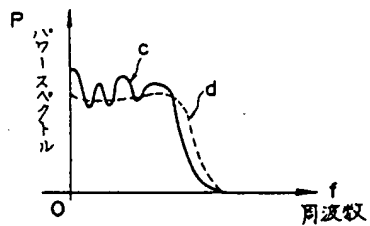
励起光と光の時間変化  
第 2 図



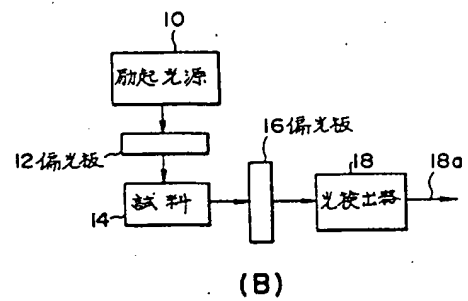
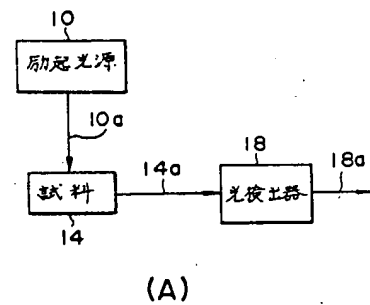
励起光と光の偏位の時間変化  
第 3 図



第 4 図



第 5 図



従来の光測定装置  
第 6 図